

2025/

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro**INHÖR  
NUMMERIEREN**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : A61K 9/127 // 38/00, 38/04, 38/21, 38/43	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/20379  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 1995 (03.08.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/00175 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Januar 1995 (18.01.95)  (30) Prioritätsdaten: P 44 02 867.9      31. Januar 1994 (31.01.94)      DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DR. RENTSCHLER ARZNEIMITTEL GMBH & CO. [DE/DE]; Mittelstrasse 18, D-88471 Laupheim (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMIDT, Peter, Chris- tian [DE/DE]; Brunsstrasse 31, D-72074 Tübingen (DE). KARAU, Christine [DE/DE]; Burgunderweg 28, D-72070 Tübingen-Unterjesingen (DE). PETSZULAT, Monika [DE/DE]; Finkenweg 3, D-88471 Laupheim (DE). WALCH, Hatto [DE/DE]; Weißdorn Weg 16, D-88471 Laupheim-Baustetten (DE).  (74) Anwälte: SCHWABE, Hans-Georg usw.; Stuntzstrasse 16, D- 81677 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen.	
(54) Title: LIPOSOMES CONTAINING ENCAPSULATED PROTEINS, METHOD OF PREPARING THEM AND PHARMACEUTI- CAL AND COSMETIC PREPARATIONS CONTAINING SUCH LIPOSOMES  (54) Bezeichnung: LIPOSOMEN ENTHALTEND DARIN VERKAPSELTE PROTEINE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG SOWIE DIESE LIPOSOMEN ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE UND KOSMETISCHE ZUBEREITUNGEN  (57) Abstract  The invention concerns liposomes which contain proteins, preferably interferons, encapsulated in them as active substances, the liposomes consisting of phosphatidyl choline, cholesterol, phosphatidyl glycerol and $\alpha$ -tocopherol in the ratio 8-4 to 5-3 to 1.5-0.5 to 0.01-0. The invention also concerns methods of preparing such liposomes and pharmaceutical and cosmetic preparations containing them.  (57) Zusammenfassung  Die Erfindung betrifft Liposomen, welche Proteine, vorzugsweise Interferone, darin verkapselt als Wirkkomponenten enthalten, wobei die Liposomen aus Phosphatidylcholin, Cholesterol, Phosphatidylglycerol und $\alpha$ -Tocopherol in einem Mengenverhältnis von 8-4 zu 5-3 zu 1,5-0,5 zu 0,01-0 bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung solcher Liposomen und diese enthaltende pharmazeutische und kosmetische Zubereitungen.		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Liposomen enthaltend darin verkapselte Proteine. Verfahren zu ihrer Herstellung sowie diese Liposomen enthaltende pharmazeutische und kosmetische Zubereitungen

Die Erfindung betrifft Liposomen, die Proteine, vorzugsweise Interferone, darin verkapselt als Wirkkomponenten enthalten, wobei diese Proteine mit einer hohen Einschlußrate verkapselt werden, Verfahren zu deren Herstellung sowie diese Liposomen enthaltende pharmazeutische und kosmetische Zubereitungen.

Verschiedene Peptidhormone oder Proteine sind in letzter Zeit als therapeutisch wirksame Mittel bei der Bekämpfung von Krankheiten wie Diabetes, Hormon- oder Wachstumsstörungen, Schilddrüsenerkrankungen aber auch viralen und/oder bakteriellen Infekten und Krebs eingesetzt worden. Solche Peptide sind beispielsweise Oxytocin, Vasopressin, FSH, TSH, LH, Tumor Nekrosis Faktoren, Growth Faktoren, Plättchen aktivierende Faktoren, Insulin, Calcitonin, Cyclosporin A, Interleukine und Interferone. In den meisten Fällen werden diese Proteine zur Therapie in Form von Lösungen injiziert. Ein weitreichendes Problem stellt dabei die Instabilität der Proteine sowohl in dieser Lösung als auch nach der Injektion in der Blutbahn dar.

In der Blutbahn werden die genannten Proteine schnell von endogenen Proteasen abgebaut und verlieren so ihre spezifische Wirkung. Andererseits stellen sie aufgrund ihrer Proteinnatur Antigene dar, die eine Immunantwort mit den entsprechenden Folgen bzw. Nebenwirkungen hervorrufen können. Trotz dieser Probleme und Nachteile ist man wegen der sehr spezifischen Wirkung der Peptidhormone und Proteine auf einzelne Zellgruppen oder Zellen auf ihren Einsatz bei der Therapie bei den genannten Krankheiten angewiesen. Im folgenden soll dies anhand des Beispiels der Interferone näher erläutert werden.

Interferone sind Proteine oder Glykoproteine, die auf äußere Reize hin von bestimmten Zellen (Leucozyten oder Fibroblasten) gebildet werden. Sie haben ein Molekulargewicht von ungefähr 20 kD, entsprechend 140 bis 160 Aminosäuren. Interferone zeichnen sich

erstens durch eine antivirale Aktivität aus. Eine solche echte Bekämpfung von Viren ist aber mit herkömmlichen Antibiotika nicht möglich.

Interferone induzieren, vermittelt über Zelloberflächenrezeptoren, die Synthese von sogenannten "antiviralen Proteinen". Diese Proteine wiederum verhindern über verschiedene Mechanismen, z.B. Transkriptionshemmung oder Oligo A-Synthese und die dadurch bewirkte Stimulation der zellulären RNase-Aktivität, die Reproduktion des Virus. Diese Wirkung ist artspezifisch. Darüber hinaus sind diese Interferone durch ihre ~~wachstumshemmende Wirkung als Cytostatika in der Krebstherapie, z.B. der Haarzell-~~Leukämie, von Bedeutung. Durch Aktivierung von Makrophagen, T-Zellen und Killerzellen wird die Immunantwort stimuliert. Außerdem wird die Ausschüttung des Tumornekrosis-Factors- $\alpha$  stimuliert, wodurch sich weitere pharmazeutisch interessante Anwendungsmöglichkeiten abzeichnen. Interferone steigern daneben die Antigenpräsentation der T-Zellen und aktivieren Makrophagen (antibakterielle Wirkung).

Bekannte Indikationen für die Gabe von Interferonen sind beispielsweise akute Viruserkrankungen wie Herpes zoster oder die Virusenzephalitis, chronische Viruserkrankungen wie die chronisch-aktive Hepatitis B, Kondylome, Warzen oder Zervixneoplasien, sowie Hämoblastosen wie die Haar-Zell-Leukämie, essentielle Thrombozythämie, chronisch lymphatische oder myeloische Leukämie, kutane T-Zell-Lymphome oder Plasmozytome. Darüber hinaus können Interferone bei der Therapie von anderen Karzinomen wie Karzinoid, Nasopharynxkarzinom, malignem Melanom oder Nierenzellkarzinom, verschiedensten entzündlichen Erkrankungen wie rheumatische Erkrankungen (chronische Polyarthrititis), Verbrennungen, Erfrierungen, die atopische Dermatitis, Psoriasis, Sklerodermie aber auch zur Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzt (vgl. Med.Mo.Pharm. 6, 1991, S.164-73).

Wie oben allgemein beschrieben, wurden die Proteine, d.h. auch die Interferone, als solche in pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt. Dabei wurden spezielle Anstren-

## 3

gungen unternommen, um diese zunächst in der zu injizierenden Lösung zu stabilisieren. Beispielsweise sind Interferon-stabilisierende Zubereitungen aus der DE-A-36 42 223 bekannt.

Zusätzlich wurde versucht, die Proteine nach der Injektion im Körper vor einem vorzeitigen Abbau durch körpereigene Proteasen zu schützen. Dazu werden die Proteine zum Beispiel in Liposomen verkapselt und so durch die zwischen dem Protein und der Protease liegende Lipidmembran(en) vor dem Abbau geschützt. Zu diesem Zweck wurden sowohl monolamellare als auch multilamellare Vesikel (Liposomen) eingesetzt. Bestimmende Faktoren der Geschwindigkeit, mit der das verkapselte Protein freigesetzt wird, sind, ohne sie vollständig anzugeben, die Größe des Vesikels, die Anzahl der Lamellen oder die Art der Komponenten, aus denen der Vesikel besteht, so US-A-5 023 087.

Liposomen, in denen ein pharmazeutischer Wirkstoff verkapselt ist, können aus einer oder mehreren Lipidkomponenten bestehen. So beschreibt US-A-5 023 087 den Einschluß von Proteinen in Liposomen aus Phosphatidylcholin (PC) und/oder Phosphatidylglycerol (PG)/Tocopherol, während die Verkapselung von Interferon in Liposomen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylserin (PS), meist in einem Mengenverhältnis von 7:3, in J.Interferon Res. 10(2), S.153-160, 1990 ( $\beta$ -IFN); J.Nat.Cancer Inst. 18(18), S.1387-92, 1989 ( $\gamma$ -IFN) oder J.Biol.Response Modif. 9(4), S.955-60, 1990 ( $\alpha$ -IFN) sowie in EP-A 89 810 133 beschrieben ist.

Andere Lipidzusammensetzungen wie Phosphatidylglycerol/Cholesterol (Ch) (2:1) zum Einschluß von  $\gamma$ -IFN (Infect.Immun. 57(1), S.132-37, 1989 oder J.Infect.Dis. 159(4), S.616-20, 1989, Molverhältnis 9:1) und PC/Ch/Sulfatide (Molverhältnis 5:4:1) zum Einschluß von Interferonen (JP 6 228 393 4) sowie PC/PG/Ch und wenig Tocopherol (Molverhältnis ca. 12:8:1 in WO-A-91 16 882 oder ca. 10:8:1 in WO-A-87 04592) zur Verkapselung von nicht-Protein Pharmaka bzw. Proteinen werden ebenso verwendet.

Ein kritischer Faktor bei der Verwendung und Synthese von Liposomen ist die Einschlußrate der betreffenden Substanz in die Liposomen. Generell gilt, daß das Protein, um tatsächlich geschützt zu werden, komplett verkapselt sein muß und nicht lediglich mit der Vesikelmembran assoziiert oder in diese inseriert sein darf. Da viele Proteine neben hydrophilen auch hydrophobe Bereiche besitzen, ist ein solcher vollständiger Einschluß nicht selbstverständlich. Liegt die Einschlußrate sehr niedrig, so ist die Konzentration des eingeschlossenen Wirkstoffes sehr gering. WO-A-90 11780 beschreibt beispielsweise bei einem Verhältnis von PC/PG/Ch von 7:3:6 eine Einschlußrate von 6,9 %. Maximale Einschlußraten für Proteine in multilamellare Vesikel werden in WO-A-87 04592 mit 10 bis 20 % beschrieben. Für nicht-Protein Pharmaka (Albuterolsulfat) werden dagegen mit Liposomen aus PC und PG im Verhältnis von 11:1 Einschlußraten von über 50 % angegeben. Solche hohen Einschlußraten sind für Proteine bislang nicht erreicht worden. Dementsprechend müssen große Mengen an Protein zur Synthese der Vesikel eingesetzt werden. Darüber hinaus müssen daher große Mengen an Substanz bei der Verabreichung von pharmazeutischen Zubereitungen, welche die Proteine verkapselt enthalten, appliziert werden. Dieses ist jedoch bei einem teuren oder schwer erhältlichen Wirkstoffen wie Peptidhormonen nicht erwünscht.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung Liposomen, die Proteine mit einer hohen Einschlußrate verkapselt enthalten, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie diese Liposomen enthaltende pharmazeutische und kosmetische Zubereitungen zur Verfügung zu stellen. Trotz der verbesserten Einschlußraten sollen die bekannten Vorteile der Verkapselung wie definierte Freisetzungsraten etc. nicht vermindert werden.

Überraschender Weise wurde gefunden, daß Einschlußraten von Proteinen in Liposomen durch den erfindungsgemäßen Einsatz von Phosphatidylglycerol in definiertem Mengenverhältnis mit Phosphatidylcholin und Cholesterol stark erhöht werden. Durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Liposomen können Einschlußraten

in die Liposomen von über 35 % gegenüber den bisher erzielbaren Raten, siehe oben, von unter 20 % erreicht werden.

Diese Steigerung der Einschlußraten ermöglicht es nun geringere Mengen an Protein zur Synthese einzusetzen und somit kostengünstiger zu produzieren. Darüber hinaus können, da mehr Wirkeinheiten pro Vesikel möglich sind, höhere Dosen des Therapeutikums appliziert oder das applizierte Volumen verringert werden.

---

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Liposomen und daraus pharmazeutische und kosmetische Zubereitungen erhalten, die alle bekannten Vorteile von in Liposomen verkapselten Proteinen aufweisen. So wird das betreffende Protein definiert aus den Vesikeln freigesetzt und ist aufgrund der Verkapselung gegenüber proteolytischem Abbau geschützt. Da die Einschlußrate jedoch höher ist, ist dieser Schutz ausgeprägter als bei nach dem Stand der Technik erhaltenen Liposomen. Die diese Liposomen enthaltenden Zubereitungen sind dementsprechend stabiler. Außerdem verringern die erfindungsgemäßen Zubereitungen die Gefahr von immunologischen Nebenreaktionen, welche auf der antigenen Wirkung der Proteine beruhen, denn diese sind eben aufgrund der Verkapselung für die Antikörper in hohem Maße unzugänglich.

Die Erfindung betrifft demzufolge mit hoher Einschlußrate in Liposomen verkapselte Proteine sowie ein Verfahren zu deren Herstellung und pharmazeutische und kosmetische Zubereitungen, die solche Liposomen enthalten.

Die proteinhaltigen Liposomen werden aus Lipid, Cholesterol, einem Phosphatidylglycerol (PG) oder dessen Derivaten und gegebenenfalls Tocopherolen oder vergleichbaren Stabilisatoren wie Butylhydroxyanisol (BHA) oder Butylhydroxytoluol (BHT) in definiertem Mengenverhältnis über das unten beschriebene Verfahren gebildet.

In den erfindungsgemäßen Liposomen beträgt das molekulare Verhältnis von Lipid zu Cholesterol zu PG zu Tocopherol zwischen 8-4 zu 5-3 zu 1,5-0,5 zu 0,01-0, vorzugsweise 6 : 4 : 1 : 0,01. Das Gewichtsverhältnis beträgt dementsprechend 8-4 zu 2,5-1,5 zu 1,5-0,5 zu 0,01-0, vorzugsweise 6 : 2 : 1 : 0,01.

Grundsätzlich können alle Proteine für verschiedene Zwecke in die Liposomen eingeschlossen werden. Vorzugsweise handelt es sich dabei aber um pharmazeutisch wirksame Substanzen wie zum Beispiel Oxytocin, Vasopressin, FSH, TSH, LH, Tumor Nekrosis Faktoren, Growth Faktoren, Plättchen-aktivierende Faktoren, Streptokinase, Urokinase, Insulin, Calcitonin, Cyclosporin A, Interleukine und Interferone. Bevorzugt werden Interferone, am meisten bevorzugt wird  $\alpha$ -Interferon. Geeignete  $\alpha$ -Interferone sind alle bekannten Subtypen des  $\alpha$ -Interferons und deren Gemische sowie dessen Derivate, einschließlich aller Subtypen.

Geeignete Derivate des Phosphatidylglycerol, die in der Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen verwendet werden, sind dessen Mono- und Diester mit gesättigten und ungesättigten C<sub>12-24</sub>-Fettsäuren. Vorzugsweise werden Palmitin-, Stearin-, Olein und Myristinsäurediester eingesetzt.

Unter "Lipid" sind in diesem Zusammenhang Phosphatidylcholine, d.h. PC und dessen Fettsäureester mit den für das PG genannten Fettsäuren, zu verstehen, beispielsweise das kommerziell erhältliche Lipoid E 100 (Warenzeichen) und die Epicurone wie Epicuron 200 (Warenzeichen).

Außerdem wird ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen mit einer hohen Einschlußrate für Proteine sowie zur Herstellung von pharmazeutischen und kosmetischen



Zubereitungen, die diese Liposomen enthalten, zur Verfügung gestellt, welches die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Lösen der Liposomenanteile in einem geeigneten Lösungsmittel, Abziehen des Lösungsmittels in einem Rotationsverdampfer und Trocknen des entstandenen Lipidfilms,
- b) Zugabe des einzuschließenden Proteins in einer pharmazeutisch geeigneten Lösung, Ablösen der Liposomen z.B. mittels Glaskugeln und anschließender Membranextrusion und
- c) Überführen der in Schritt (b) erhaltenen Liposomen in eine pharmazeutisch oder kosmetisch geeignete Form beispielsweise ein Gel, eine Creme, eine Lotion, eine Lösung oder ein Spray mittels bekannter Verfahren und unter Verwendung geeigneter Träger- und Hilfsstoffe.

Nach Verfahrensschritt (b) werden oligolamellare Liposomen mit einem Durchmesser von etwa 200 nm erhalten. Eine solche Liposomengröße ermöglicht eine definierte und kontrollierte Freisetzung der verkapselten Proteine, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit einer Einschlußrate von über 35 % verkapselt werden. Die nach dem Verfahren hergestellten Zubereitungen können somit höhere Dosen an Wirkstoff pro Vesikel enthalten und erlauben daher eine höhere Dosierung in der Anwendung oder die Applikation geringerer Mengen.

Darüber hinaus stabilisieren die erfindungsgemäßen Liposomen die darin verkapselten Proteine. Ihre biologische Aktivität bleibt im Vergleich mit in Liposomen des Standes der Technik eingeschlossenen Proteinen über einen längeren Zeitraum nahezu unverändert. Daher weisen die pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen, die die erfindungsgemäßen Liposomen enthalten, eine deutlich verbesserte Lagerfähigkeit auf.

Geeignete Lösungsmittel zur Anwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Lösen der Lipidkomponenten sind alle inerten organischen Lösungsmittel mit hohem

Dampfdruck bei Raumtemperatur wie Chloroform, Methylenchlorid, Aceton, Methyl-ethylketon, Hexan, Cyclohexan und dergleichen. Die genannte, pharmazeutisch geeignete Lösung ist eine gepufferte, isotonische Lösung. Bevorzugt ist eine Natriumphosphat-gepufferte, mit NaCl isotonierte, Serumalbumin enthaltende Lösung.

In jeder genannten Zubereitung können die Liposomen neben dem verkapselten Protein weitere pharmazeutisch oder kosmetisch wirksame Substanzen eingeschlossen enthalten.

---

Zum Erhalt eines Gels werden bekannte Gelbildner eingesetzt, die in der Lage sind, ohne die Einwirkung hoher Scherkräfte, die zu einem weitgehenden Verlust der Proteinaktivität führen würden, Gele mit den Liposomen zu bilden. Solche Gelbildner stammen aus der Reihe der halbsynthetischen Cellulosederivate sowie der Alginat. Bevorzugt sind Natriumcarboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose sowie Natriumalginat. Cremes und Lotionen können entsprechend über bekannte Verfahren formuliert werden. Diese pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen können darüber hinaus alle bekannten Stabilisatoren, Antioxidantien, Pigmente, Geruchsstoffe und andere Hilfsstoffe enthalten, unter der Maßgabe, daß sie die Stabilität der Liposomen und der sie bildenden Komponenten nicht beeinträchtigen.

Erfindungsgemäße Zubereitungen in Form von Lösungen, die die oben erhaltenen Liposomen enthalten, werden gemäß dem beschriebenen Verfahren hergestellt, indem die Liposomen mit pharmazeutisch geeigneten, isotonisierenden Lösungen auf die gewünschte Konzentration gebracht werden. Pharmazeutisch und kosmetisch geeignete Lösungen sind mit einem verträglichen Puffer, wie Natriumphosphat oder Citrat, der auch die Stabilität des Proteins nicht beeinträchtigt, eingestellt und können mit Hilfe von NaCl, Polyolen, Zuckern oder Zuckeralkoholen isotonisiert sein. Diesen Lösungen können alle bekannten und üblichen Stabilisatoren, Antioxidantien, Pigmente, Additive, Proteine wie Serumalbumin, Zucker, Polyole und Zuckeralkohole zugesetzt werden unter der

Voraussetzung, daß diese Zusätze die Stabilität der Liposomenkomponenten nicht beeinträchtigen.

Die erfindungsgemäß erhaltenen Zubereitungen können auf verschiedene Arten appliziert werden. In Form von Lösungen können sie auf verschiedenste Weise (i.v., i.p., i.c., s.c.) injiziert werden, so können sie z.B. bei der intratumoralen Injektion direkt in den Tumor eingespritzt werden. Dafür wird eine sterile Zubereitung benötigt, die durch aseptische Herstellung der Liposomen mit einer Sterilfiltration als Endstufe nach der Herstellung der Lösung erfolgen kann. Da die oligolamellaren Liposomen durch Extrusion durch Membranen vom Durchmesser 200 nm hergestellt werden können, ist die Sterilfiltration in der Endstufe dann ein zusätzlicher Schritt zur Qualitätsabsicherung.

Eine weitere mögliche Applikationsform für Lösungen sind Sprays, zur Verabreichung der in den Liposomen enthaltenen Wirkkomponente über die Haut oder Schleimhäute.

Außerdem können die pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen epicutan appliziert werden. Dazu muß die Liposomensuspension in eine Gel-, Creme- oder Lotionform, wie oben beschrieben, überführt werden. Diesen streichfähigen Zubereitungen können natürlich alle oben erwähnten Zusatzstoffe zugesetzt werden.

Folgende Beispiele sollen die Erfindung erläutern, ohne sie jedoch zu beschränken.

#### Beispiel 1

Human- $\alpha$ -Interferon enthaltende Liposomen werden auf folgende Weise hergestellt:  
0,335 g Lipoid E 100, 0,11 g Cholesterol, 0,055 g PG und 0.5 mg  $\alpha$ -Tocopherol werden in 50 ml Chloroform gelöst. 20 ml dieser Lösung werden in einem 100 ml

Rundkolben bei Raumtemperatur am Rotavapor eingedampft und 1 Std. bei einem Druck von 0,7-2,0 kPa nachgetrocknet. Es resultiert ein Lipidfilm an der Wand des Rundkolbens.

240  $\mu$ l Human- $\alpha$ -Interferon (6000000 I.E./ml) werden mit 2160  $\mu$ l eines Inkubationspuffers (1,5 g Serumalbumin, 0,3 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 8,0 g NaCl pro l Wasser; entsprechend einer 1:10 Verdünnung) verdünnt. 2 ml dieser Lösung werden in den Rundkolben mit dem Lipidfilm gegeben und dieser Film mit Hilfe von 0,6 g Glaskugeln abgezogen. Es bildet sich eine Interferon-haltige Lipidsuspension mit multilamellaren Vesikeln, die in Portionen von 0,5 ml durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porenweite von 200 nm mit Hilfe eines Miniextruders extrudiert wird. Man erhält eine Interferon-haltige oligolamellare Liposomensuspension.

Die direkte Analyse der Suspension mit dem ELISA-Test ergibt als Summe des freien und des außen an die Liposomen gebundene  $\alpha$ -Interferon-Anteils einen Wert von 391000 I.E./ml, der verkapselte Anteil beträgt 209000 I.E./ml entsprechend 35 %.

### Beispiel 2

Human- $\alpha$ -Interferon enthaltende Liposomen werden auf folgende Weise hergestellt: 0,338 g Lipoid E 100, 0,112 g Cholesterol, 0,05 g Dimyristoylphosphatidylglycerol und 0,5 mg  $\alpha$ -Tocopherol werden in 50 ml Chloroform gelöst. 20 ml dieser Lösung werden in einem 100 ml Rundkolben bei Raumtemperatur am Rotavapor eingedampft und eine Std. bei einem Druck von 0,7-2,0 kPa nachgetrocknet. Es resultiert ein Lipidfilm an der Wand des Rundkolbens.

240  $\mu$ l Human- $\alpha$ -Interferon (6000000 I.E./ml) werden mit 2160  $\mu$ l eines Inkubationspuffers (1,5 g Serumalbumin, 0,3 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 8,0 g NaCl pro l

Wasser; entsprechend einer 1:10 Verdünnung) verdünnt. 2 ml dieser Lösung werden in den Rundkolben mit dem Lipidfilm gegeben und dieser Film mit Hilfe von 0,6 g Glaskugeln abgezogen. Es bildet sich eine Interferon-haltige Lipidsuspension mit multilamellaren Vesikeln, die in Portionen von 0,5 ml durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porenweite von 200 nm mit Hilfe eines Miniextruders extrudiert wird. Man erhält eine Interferon-haltige oligolamellare Liposomensuspension.

Die direkte Analyse der Suspension mit dem ELISA-Test ergibt als Summe des freien und des außen an die Liposomen gebundene  $\alpha$ -Interferon-Anteils einen Wert von 313000 I.E./ml, der verkapselte Anteil beträgt 287000 I.E./ml entsprechend 48 %.

### Beispiel 3 (Vergleichsbeispiel)

Human- $\alpha$ -Interferon enthaltende Liposomen werden auf folgende Weise hergestellt: 0.376 g Lipoid E 100, 0,124 g Cholesterol und 0.5 mg  $\alpha$ -Tocopherol werden in 50 ml Chloroform gelöst. 20 ml dieser Lösung werden in einem 100 ml Rundkolben bei Raumtemperatur am Rotavapor eingedampft und eine Std. bei einem Druck von 0,7-2,0 kPa nachgetrocknet. Es resultiert ein Lipidfilm an der Wand des Rundkolbens.

240  $\mu$ l Human- $\alpha$ -Interferon (6000000 I.E./ml) werden mit 2160  $\mu$ l eines Inkubationspuffers (1,5 g Serumalbumin, 0,3 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 8,0 g NaCl pro l Wasser; entsprechend einer 1:10 Verdünnung) verdünnt. 2 ml dieser Lösung werden in den Rundkolben mit dem Lipidfilm gegeben und dieser Film mit Hilfe von 0,6 g Glaskugeln abgezogen. Es bildet sich eine Interferon-haltige Lipidsuspension mit multilamellaren Vesikeln, die in Portionen von 0,5 ml durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porenweite von 200 nm mit Hilfe eines Miniextruders extrudiert wird. Man erhält eine Interferon-haltige oligolamellare Liposomensuspension.

Die direkte Analyse der Suspension mit dem ELISA-Test ergibt als Summe des freien und des außen an die Liposomen gebundene  $\alpha$ -Interferon-Anteils einen Wert von 554000 I.E./ml, der verkapselte Anteil beträgt 46000 I.E./ml entsprechend 8 %.

Tabelle 1

Bsp.	Mengen- verhältnis PC/Ch/PG	geb. IFN (I.E./ml)	verkapseltes IFN (I.E./ml)	Einschluß- rate (%)
1	6:4:1	391000	209000	35
2	6:4:1	313000	287000	48
3 (Vergleich)	<sup>4</sup> 6:2:0	554000	46000	8

In Tabelle 1 sind die Einschlußraten der Beispiele 1 und 2 sowie des Vergleichsbeispiels 3 noch einmal dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, daß die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches auf einem definierten Mengenverhältnis der die Liposomen konstituierenden Lipidkomponenten beruht, zu einer signifikanten Erhöhung der Einschlußraten führt.

#### Beispiel 4

Human- $\alpha$ -Interferon enthaltende Liposomen werden auf folgende Weise hergestellt: 0,336 g Lipoid E 100, 0,111 g Cholesterol, 0,054 g Dipalmitoylphosphatidylglycerol und 0.5 mg  $\alpha$ -Tocopherol werden in 50 ml Chloroform gelöst. 20 ml dieser Lösung

werden in einem 100 ml Rundkolben bei Raumtemperatur am Rotavapor eingedampft und eine Std. bei einem Druck von 0,7-2,0 kPa nachgetrocknet. Es resultiert ein Lipidfilm an der Wand des Rundkolbens.

240  $\mu$ l Human- $\alpha$ -Interferon (6000000 I.E./ml) werden mit 2160  $\mu$ l eines Inkubationspuffers (1,5 g Serumalbumin, 0,3 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 8,0 g NaCl pro l Wasser; entsprechend einer 1:10 Verdünnung) verdünnt. 2 ml dieser Lösung werden in den Rundkolben mit dem Lipidfilm gegeben und dieser Film mit Hilfe von 0,6 g Glaskugeln abgezogen. Es bildet sich eine Interferon-haltige Lipidsuspension mit multilamellaren Vesikeln, die in Portionen von 0,5 ml durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porenweite von 200 nm mit Hilfe eines Miniextruders extrudiert wird. Man erhält eine Interferon-haltige oligolamellare Liposomensuspension.

#### Beispiel 5

Human- $\alpha$ -Interferon enthaltende Liposomen werden auf folgende Weise hergestellt: 0.333 g Lipoid E 100, 0,11 g Cholesterol, 0,057 g Distearoylphosphatidylglycerol und 0.5 mg  $\alpha$ -Tocopherol werden in 50 ml Chloroform gelöst. 20 ml dieser Lösung werden in einem 100 ml Rundkolben bei Raumtemperatur am Rotavapor eingedampft und eine Std. bei einem Druck von 0,7-2,0 kPa nachgetrocknet. Es resultiert ein Lipidfilm an der Wand des Rundkolbens.

240  $\mu$ l Human- $\alpha$ -Interferon (6000000 I.E./ml) werden mit 2160  $\mu$ l eines Inkubationspuffers (1,5 g Serumalbumin, 0,3 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 8,0 g NaCl pro l Wasser; entsprechend einer 1:10 Verdünnung) verdünnt. 2 ml dieser Lösung werden in den Rundkolben mit dem Lipidfilm gegeben und dieser Film mit Hilfe von 0,6 g Glaskugeln abgezogen. Es bildet sich eine Interferon-haltige Lipidsuspension mit multilamellaren Vesikeln, die in Portionen von 0,5 ml durch eine Polycarbonatmembran

mit einer Porenweite von 200 nm mit Hilfe eines Miniextruders extrudiert wird. Man erhält eine Interferon-haltige oligolamellare Liposomensuspension.

#### Beispiel 6

Zu 1970  $\mu$ l einer gemäß Beispiel 1,2,4 oder 5 hergestellten Liposomensuspension werden 30 mg Natriumcarboxymethylcellulose (Tylopur C 300 P, eingetragenes Warenzeichen) zugesetzt und der Ansatz 6 Std. quellen gelassen. Es entsteht ein auf der Haut streichfähiges Gel.

#### Beispiel 7

Zu 1960  $\mu$ l einer gemäß Beispiel 1,2,4 oder 5 hergestellten Liposomensuspension werden 40 mg Hydroxyethylcellulose (Tylose H 300, eingetragenes Warenzeichen) zugesetzt und der Ansatz 6 Std. quellen gelassen. Es entsteht ein auf der Haut streichfähiges Gel.

#### Beispiel 8

Zu 1750  $\mu$ l einer gemäß Beispiel 1,2,4 oder 5 hergestellten Liposomensuspension werden 250 mg Hydroxypropylmethylcellulose (Pharmacoat 606, eingetragenes Warenzeichen) zugesetzt und der Ansatz 12 Std. quellen gelassen. Es entsteht ein auf der Haut streichfähiges Gel.

#### Beispiel 9

Zu 1970  $\mu$ l einer gemäß Beispiel 1,2,4 oder 5 hergestellten Liposomensuspension werden 30 mg Natriumalginat (Kelgin F, eingetragenes Warenzeichen) zugesetzt und der Ansatz 6 Std. quellen gelassen. Es entsteht ein auf der Haut streichfähiges Gel.



Beispiel 10

Die Stabilität der Liposomen wurde anhand ihres Interferongehaltes bestimmt. Die Liposomen wurden gemäß Beispiel 2 und 3 (Vergleichsbeispiel) hergestellt und anschließend für die angegebene Zeit bei 4 °C gelagert. Der Interferongehalt wurde über übliche Verfahren bestimmt.

Tabelle 2


---

Lagerzeit (Tage)	Beispiel 2 Interferon (I.U./ml) (%)		Lagerzeit (Tage)	Beispiel 3 (Vergleich) Interferon (I.U./ml) (%)	
0	600000	100	0	600000	100
3	519419	86,6	2	452207	75,4
6	559241	93,2	6	400011	66,7
11	575890	96,0			
18	614076	102,3	16	383082	63,8
25	567961	94,7	30	326904	54,5
34	505472	84,2			
52	576860	96,1	42	314071	52,3

Aus Tabelle 2 geht deutlich hervor, daß die erfindungsgemäße Verwendung von PG als Ladungsträger das in den Liposomen verkapselte Interferon über einen längeren Zeitraum zu stabilisieren vermag als dies nach dem Stand der Technik (Beispiel 3) möglich ist.

Patentansprüche

1. Liposomen enthaltend darin verkapselte Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen aus Phosphatidylcholin, Cholesterol, Phosphatidylglycerol und Tocopherolen in einem molaren Verhältnis von 8-4 zu 5-3 zu 1,5-0,5 zu 0,01-0 bestehen.
2. Liposomen gemäß Anspruch 1, bei denen das Verhältnis der die Liposomen konstituierenden Komponenten 6 : 4 : 1 : 0,01 beträgt.
3. Liposomen gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, bei denen das Phosphatidylglycerolderivat ein Mono- oder Diester desselben mit einer gesättigten oder ungesättigten C<sub>12-24</sub>-Fettsäure ist.
4. Liposomen gemäß Anspruch 3, bei denen das Phosphatidylglycerolderivat dessen Myristoyl-, Stearoyl- oder Palmitoyldiester ist.
5. Liposomen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, bei denen das verkapselte Protein Oxytocin, Vasopressin, FSH, TSH, LH, ein Tumor Nekrosis Faktor, ein Growth Faktor, ein Plättchen aktivierender Faktor, Streptokinase, Urokinase, Insulin, Calcitonin, Cyclosporin A, ein Interleukin oder Interferon ist.
6. Liposomen gemäß Anspruch 5, bei denen das verkapselte Protein ein Interferon ist.
7. Liposomen gemäß Anspruch 6, bei denen das verkapselte Protein  $\alpha$ -Interferon ist.
8. Liposomale Zubereitung enthaltend Liposomen gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, welche in Form eines Gels vorliegt und bei der der Gelbildner ein Cellulosederivat oder ein Alginat ist.

9. Liposomale Zubereitung gemäß Anspruch 8, in der der Gelbildner Natriumcarboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose oder Natriumalginat ist.
10. Liposomale Zubereitung enthaltend Liposomen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, die in Form einer Lösung vorliegt.
11. Zubereitung gemäß Anspruch 10, bei der die Lösung isotonisiert und mit einem pharmazeutisch geeigneten Puffer auf pH 7,4 eingestellt ist.
12. Liposomale Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 10 und 11, die aseptisch zubereitet und durch eine Membranfiltration sterilisiert ist.
13. Verfahren zur Herstellung von Liposomen, die darin verkapselte Proteine enthalten, welches die folgenden Schritte umfaßt:
  - a) Lösen von Phosphatidylcholin, Cholesterol, Phosphatidylglycerol und Tocopherol in einem Mengenverhältnis von 8-4 zu 5-3 zu 1,5-0,5 zu 0,01-0 in einem geeigneten Lösungsmittel, Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen des Lipidfilms, und
  - b) Zugabe des Proteins in einer pharmazeutisch geeigneten Lösung, Ablösen der Liposomen mittels Glaskugeln und anschließender Membranextrusion der Liposomen.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, in welchem das Mengenverhältnis 6 : 4 : 1 : 0,01 beträgt.

15. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche 13 und 14, in dem das Phosphatidylglycerolderivat ein Mono- oder Diester desselben mit einer gesättigten oder ungesättigten C<sub>12-24</sub>-Fettsäure ist.
16. Verfahren gemäß Anspruch 15, in dem das Phosphatidylglycerolderivat dessen Myristoyl-, Stearoyl- oder Palmitoyldiester ist.
17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 16, in dem das verkapselte Protein Oxytocin, Vasopressin, FSH, TSH, LH, ein Tumor Nekrosis Faktor, ein Growth Faktor, ein Plättchen aktivierender Faktor, Streptokinase, Urokinase, Insulin, Calcitonin, Cyclosporin A, ein Interleukin oder Interferon ist.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, in dem das verkapselte Protein ein Interferon ist.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, in dem das verkapselte Protein  $\alpha$ -Interferon ist.
20. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche 13 bis 19, bei dem eine pharmazeutische oder kosmetische Zubereitung in streichfähiger Form erhalten wird, indem die aus Schritt (b) erhaltenen Liposomen mittels bekannter Verfahren unter Verwendung bekannter Träger- und Hilfsstoffe in eine pharmazeutisch und kosmetisch geeignete Form wie ein Gel, eine Creme oder eine Lotion überführt wird, wobei der Gelbildner ein Cellulosederivat oder ein Alginat ist.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, bei dem der Gelbildner Natriumcarboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose oder Natriumalginat ist.
22. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche 13-19, bei dem eine pharmazeutische Zubereitung erhalten wird, die in Form einer Lösung vorliegt, indem die

aus Schritt (b) erhaltenen Liposomen mittels bekannter Verfahren unter Verwendung bekannter Träger- und Hilfsstoffe in eine Lösung überführt werden.

23. Verfahren gemäß Anspruch 22, bei dem die Lösung mit NaCl isotoniert und mit einem Puffer auf pH 7,4 eingestellt ist.

24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 und 23, bei dem die pharmazeutische Zubereitung aseptisch zubereitet und durch eine Membranfiltration sterilisiert ist.

---

## GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 21. Juni 1995 (21.06.95);  
ursprüngliche Ansprüche 1-24 durch geänderte  
Ansprüche 1-18 ersetzt (3 Seiten)]

Patentansprüche

1. Liposomen enthaltend darin verkapselte Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen aus Phosphatidylcholin, Cholesterol, Phosphatidylglycerol und Tocopherolen in einem molaren Verhältnis von 6 zu 4 zu 1 zu 0,01 bestehen.
2. Liposomen gemäß Anspruch 1, bei denen das Phosphatidylglycerolderivat ein Mono- oder Diester desselben mit einer gesättigten oder ungesättigten C<sub>12-24</sub>-Fettsäure ist.
3. Liposomen gemäß Anspruch 2, bei denen das Phosphatidylglycerolderivat dessen Myristoyl-, Stearoyl- oder Palmitoyldiester ist.
4. Liposomen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, bei denen das verkapselte Protein Oxytocin, Vasopressin, FSH, TSH, LH, ein Tumor Nekrosis Faktor, ein Growth Faktor, ein Plättchen aktivierender Faktor, Streptokinase, Urokinase, Insulin, Calcitonin, Cyclosporin A, ein Interleukin oder Interferon ist.
5. Liposomale Zubereitung enthaltend Liposomen gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, welche in Form eines Gels vorliegt und bei der der Gelbildner ein Cellulosederivat oder ein Alginat ist.
6. Liposomale Zubereitung gemäß Anspruch 5, in der der Gelbildner Natriumcarboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose oder Natriumalginat ist.
7. Liposomale Zubereitung enthaltend Liposomen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, die in Form einer Lösung vorliegt.

8. Zubereitung gemäß Anspruch 7, bei der die Lösung isotonisiert und mit einem pharmazeutisch geeigneten Puffer auf pH 7,4 eingestellt ist.
9. Liposomale Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 7 und 8, die aseptisch zubereitet und durch eine Membranfiltration sterilisiert ist.
10. Verfahren zur Herstellung von Liposomen, die darin verkapselte Proteine enthalten, welches die folgenden Schritte umfaßt:

---

  - a) Lösen von Phosphatidylcholin, Cholesterol, Phosphatidylglycerol und Tocopherol in einem Mengenverhältnis von 6 zu 4 zu 1 zu 0,01 in einem geeigneten Lösungsmittel, Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen des Lipidfilms, und
  - b) Zugabe des Proteins in einer pharmazeutisch geeigneten Lösung, Ablösen der Liposomen mittels Glaskugeln und anschließender Membranextrusion der Liposomen.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, in dem das Phosphatidylglycerolderivat ein Mono- oder Diester desselben mit einer gesättigten oder ungesättigten C<sub>12-24</sub>-Fettsäure ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, in dem das Phosphatidylglycerolderivat dessen Myristoyl-, Stearoyl- oder Palmitoyldiester ist.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, in dem das verkapselte Protein Oxytocin, Vasopressin, FSH, TSH, LH, ein Tumor Nekrosis Faktor, ein Growth Faktor, ein Plättchen aktivierender Faktor, Streptokinase, Urokinase, Insulin, Calcitonin, Cyclosporin A, ein Interleukin oder Interferon ist.

14. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche 10 bis 13, bei dem eine pharmazeutische oder kosmetische Zubereitung in streichfähiger Form erhalten wird, indem die aus Schritt (b) erhaltenen Liposomen mittels bekannter Verfahren unter Verwendung bekannter Träger- und Hilfsstoffe in eine pharmazeutisch und kosmetisch geeignete Form wie ein Gel, eine Creme oder eine Lotion überführt wird, wobei der Gelbildner ein Cellulosederivat oder ein Alginat ist.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, bei dem der Gelbildner Natriumcarboxymethylcellulose, Hydroxyethylcellulose, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose oder Natriumalginat ist.
16. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche 10 bis 13, bei dem eine pharmazeutische Zubereitung erhalten wird, die in Form einer Lösung vorliegt, indem die aus Schritt (b) erhaltenen Liposomen mittels bekannter Verfahren unter Verwendung bekannter Träger- und Hilfsstoffe in eine Lösung überführt werden.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, bei dem die Lösung mit NaCl isotoniert und mit einem Puffer auf pH 7,4 eingestellt ist.
18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 16 und 17, bei dem die pharmazeutische Zubereitung aseptisch zubereitet und durch eine Membranfiltration sterilisiert ist.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 95/00175

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>6</sup>: A 61 K 9/127, //A 61 K 38/00, A 61 K 38/04, A 61 K 38/21,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>6</sup>: A 61 K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, A, 4 933 121 (LAW S.-J. et al.) 12 June 1990 (12.06.90), Claims 1-4; Column 2, Lines 30-54.	1,3-5, 10,11,13, 15-17, 22,23
X	US, A, 4 241 046 (PAPAHADJOPOULOS D.P. et al.), 23 December 1980 (23.12.80), Abstract; Column 2, Lines 39-53; Column 6, Lines 36-48; Column 4, Lines 1-23, 39-49, Example 1.	1,5, 10,11, 13,17, 22,23
X	WO, A, 91/16 882 (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.) 14 November 1991 (14.11.91), Claims 1,2,4-6; Page 5, Lines 4-30; Page 9, Lines 1-26; Page 24, Lines 15-28 (cited in the application).	1,3-7, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.    ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 1995 (28.03.95)

Date of mailing of the international search report

24 April 1995 (24.04.95)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 95/00175

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A, 87/04 592 (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.) 13 August 1987 (13.08.87), Claims 6-12; Page 7, Line 8 - Page 8, Line 24; Page 9, Lines 29-32; Page 11, Line 20 - Page 12, Line 5; Page 27, Lines 18-24; Example 1; Tables 1-C (cited in the application).	1,5-7, 10-12
Y	Claims 6-12.	13-19, 22-24
Y	-- THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, Volume 159, No. 4, Published April 1989, D.A. EPPSTEIN et al. "Liposomal Interferon-B: Sustained Release Treatment of Simian Varicella Virus Infection in Monkeys", Pages 616 - 620, in particular page 617, left hand column, 3 paragraph.	13-19, 22-24
X	WO, A, 86/06 959 (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.) 04 December 1986 (04.12.86), Claims 1,2,16; Page 39, Line 34 - Page 40, Line 24; Page 41, Lines 28-33; Page 45, Lines 3-6.	1-7
X	-- US, A, 5 049 392 (WEINER A.L. et al.), 17 September 1991 (17.09.91), Abstract; Column 1, Line 65 - Column 2, Line 33; Column 6, Lines 12-38; Column 7, Lines 37-68; Example 2; Claims 1,10,11.	1,3-6,13, 15-19, 22
X	-- US, A, 4 752 425 (MARTIN F.J. et al.), 21 June 1988 (21.06.88), Claim 1; Column 12, Lines 26-31; Example 1; Column 6, Line 24 - Column 7, Line 43.	1,5-7,10,13, 17,19, 22,23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ EP 95/00175

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A, 88/01 864 (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.) 24 March 1988 (24.03.88), Abstract; Page 11, Line 14 - Page 13, Line 26; Example I.	1,5-7, 10,11
X	EP, A, 0 432 693 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY) 19 June 1991 (19.06.91), Claims 1,2,4,5; Page 4, Lines 3-7; Page 5, Lines 48, 49.	1,3,4
X	EP, A, 0 357 005 (NIPPON FINE CHEMICAL CO.,LTD.) 07 March 1990 (07.03.90), Claim 1; Examples 1-3; Page 3, Lines 4-7, 36-54; Page 4, Lines 51-57.	1,3-5

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen  
PCT/EP 95/00175

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

A 61 K 9/127, // A 61 K 38/00, A 61 K 38/04, A 61 K 38/21.  
A 61 K 38/43

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK 6

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A 61 K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US, A, 4 933 121 (LAW S.-J. et al.) 12 Juni 1990 (12.06.90), Ansprüche 1-4; Spalte 2, Zeilen 30-54. --	1,3-5, 10,11, 13, 15-17, 22,23
X	US, A, 4 241 046 (PAPAHADJOPOULOS D.P. et al.) 23 Dezember 1980 (23.12.80), Zusammenfassung; Spalte 2, Zeilen 39-53; Spalte 6, Zeilen 36-48; Spalte 4, Zeilen 1-23,39-49, Beispiel 1. --	1,5, 10,11, 13,17, 22,23
X	WO, A, 91/16 882 (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.) 14 November 1991 (14.11.91), Ansprüche 1,2,4-6; Seite 5.	1, 3-7, 10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\* "&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28 März 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24.04.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

MAZZUCCO e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	<p>Zeilen 4-30; Seite 9,            Zeilen 1-26; Seite 24,            Zeilen 15-28            (in der Beschreibung            genannt).</p> <p>--</p>	
X	<p>WO, A, 87/04 592            (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.)            13 August 1987 (13.08.87),            Ansprüche 6-12; Seite 7,            Zeile 8 - Seite 8, Zeile 24;            Seite 9, Zeilen 29-32;            Seite 11, Zeile 20 -            Seite 12, Zeile 5; Seite 27,            Zeilen 18-24; Beispiel 1;            Tabelle 1-C            (in der Beschreibung            genannt).</p>	<p>1,            5-7,            10-12</p>
Y	<p>Ansprüche 6-12.</p>	<p>13-19,            22-24</p>
Y	<p>--</p> <p>THE JOURNAL OF INFECTIOUS            DISEASES, Band 159, Nr. 4,            veröffentlicht April 1989,            D.A. EPPSTEIN et al.            "Liposomal Interferon-<math>\beta</math>:            Sustained Release Treatment            of Simian Varicella Virus            Infection in Monkeys",            Seiten 616-620,            insbesondere Seite 617,            linke Spalte, 3. Absatz.</p>	<p>13-19,            22-24</p>
X	<p>--</p> <p>WO, A, 86/06 959            (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.)            04 Dezember 1986 (04.12.86),            Ansprüche 1,2,16; Seite 39,            Zeile 34 - Seite 40,            Zeile 24; Seite 41,            Zeilen 28-33; Seite 45,            Zeilen 3-6.</p>	<p>1-7</p>
X	<p>--</p> <p>US, A, 5 049 392            (WEINER A.L. et al.)            17 September 1991 (17.09.91),            Zusammenfassung; Spalte 1,            Zeile 65 - Spalte 2,            Zeile 33; Spalte 6,            Zeilen 12-38; Spalte 7,            Zeilen 37-68; Beispiel 2;            Ansprüche 1,10,11.</p>	<p>1,3-6,            13,,            15-19,            22</p>
X	<p>--</p> <p>US, A, 4 752 425</p>	<p>1,5-7,</p>

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
	(MARTIN F.J. et al.) 21 Juni 1988 (21.06.88), Anspruch 1; Spalte 12, Zeilen 26-31; Beispiel 1; Spalte 6, Zeile 24 - Spalte 7, Zeile 43. --	10, 13, 17, 19, 22, 23
X	WO, A, 88/01 864 (LIPOSOME TECHNOLOGY, INC.) 24 März 1988 (24.03.88), Zusammenfassung; Seite 11, Zeile 14 - Seite 13, Zeile 26; Beispiel I. --	1, 5-7, 10, 11
X	EP, A, 0 432 693 (SUMITOMO CHEMICAL COMPANY) 19 Juni 1991 (19.06.91), Ansprüche 1, 2, 4, 5; Seite 4, Zeilen 3-7; Seite 5, Zeilen 48, 49. --	1, 3, 4
X	EP, A, 0 357 005 (NIPPON FINE CHEMICAL CO., LTD.) 07 März 1990 (07.03.90), Anspruch 1; Beispiele 1-3; Seite 3, Zeilen 4-7, 36-54; Seite 4, Zeilen 51-57. ----	1, 3-5

## ANHANG

zum internationalen Recherchen-  
bericht über die internationale  
Patentanmeldung Nr.

## ANNEX

to the International Search  
Report to the International Patent  
Application No.

## ANNEXE

au rapport de recherche inter-  
national relatif à la demande de brevet  
international n°

PCT/EP 9500175 SAE 103428

In diesem Anhang sind die Mitglieder  
der Patentfamilien der in obenge-  
nannten internationalen Recherchenbericht  
angeführten Patentdokumente angegeben.  
Diese Angaben dienen nur zur Unter-  
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family  
members relating to the patent documents  
cited in the above-mentioned inter-  
national search report. The Office is  
in no way liable for these particulars  
which are given merely for the purpose  
of information.

La présente annexe indique les  
membres de la famille de brevets  
relatifs aux documents de brevets cités  
dans le rapport de recherche inter-  
national visé ci-dessus. Les renseigne-  
ments fournis sont donnés à titre indica-  
tif et n'engagent pas la responsabilité  
de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
US A 4933121	12-06-90	US A 5094785	10-03-92
US A 4241046	23-12-80	BE A1 874408	23-08-79
		DE A1 2907303	06-09-79
		EP A1 4223	19-09-79
		EP B1 4223	09-09-81
		ES A1 478056	16-04-80
		ES A5 478056	16-05-80
		FR A1 2418023	21-09-79
		FR B1 2418023	13-05-83
		GB A1 2015464	12-09-79
		GB B2 2015464	18-08-82
		US A 4235871	25-11-80
		US A 4394149	19-07-83
		US A 4394448	19-07-83
WO A1 9116882	14-11-91	AU A1 79087/91	27-11-91
		CA AA 2081474	09-11-91
		EP A1 527940	24-02-93
		JP T2 5507090	14-10-93
WO A1 8704592	13-08-87	AU A1 71288/87	25-08-87
		EP A1 256119	24-02-88
		JP T2 63502117	18-08-88
		US A 5023087	11-06-91
WO A1 8606959	04-12-86	AT E 78158	15-08-92
		AU A1 59564/86	24-12-86
		AU B2 587472	17-08-89
		CA A1 1257836	25-07-89
		DE C0 3686025	20-08-92
		DE T2 3686025	07-01-93
		DK A0 329/87	21-01-87
		DK A 329/87	23-03-87
		EP A1 223831	03-06-87
		EP B1 223831	15-07-92
		JP T2 63500175	21-01-88
		NO A 870237	20-01-87
		US A 4895719	23-01-90
		US A 5192528	09-03-93
		US A 5340587	23-08-94
		US A 4778378	18-10-88
		US A 4898531	06-02-90
		US A 4793799	27-12-88
		US A 4906178	06-03-90
		US A 5281131	25-01-94
		US A 5356487	18-10-94
		US A 4806095	21-02-89
		US A1 31583/84	04-03-85
		CA A1 1234899	05-04-88
		EP A1 151611	21-08-85
		ES A1 534593	01-03-86
		ES A5 534593	31-03-86
		ES A1 8605089	01-08-86
		JP T2 60501913	07-11-85
		WO A1 8500647	14-02-85



## ANHANG

zum internationalen Recherchen-  
bericht über die internationale  
Patentanmeldung Nr.

## ANNEX

to the International Search  
Report to the International Patent  
Application No.

## ANNEXE

au rapport de recherche inter-  
national relatif à la demande de brevet  
international n°

PCT/EP 9500175 SAE 103428

In diesem Anhang sind die Mitglieder  
der Patentfamilien der in obenge-  
nannten internationalen Recherchenbericht  
angeführten Patentedokumente angegeben.  
Diese Angaben dienen nur zur Unter-  
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family  
members relating to the patent documents  
cited in the above-mentioned inter-  
national search report. The Office is  
in no way liable for these particulars  
which are given merely for the purpose  
of information.

La présente annexe indique les  
membres de la famille de brevets  
relatifs aux documents de brevets cités  
dans le rapport de recherche inter-  
national visée ci-dessus. Les renseigne-  
ments fournis sont donnés à titre indica-  
tif et n'engagent pas la responsabilité  
de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
US A 5049392	17-09-91	AU A1 48475/90 AU B2 630144 CA AA 2045122 EP A1 454733 EP A4 454733 JP T2 4504222 WO A1 9007920	13-08-90 22-10-92 19-07-90 06-11-91 27-11-91 30-07-92 26-07-90
US A 4752425	21-06-88	AU A1 80389/87 AU B2 598601 EP A1 285638 JP T2 1501228 WO A1 8801864 US A 4781871	07-04-88 28-06-90 12-10-88 27-04-89 24-03-88 01-11-88
WO A1 8801864	24-03-88	AU A1 80389/87 AU B2 598601 EP A1 285638 JP T2 1501228 US A 4781871 US A 4752425	07-04-88 28-06-90 12-10-88 27-04-89 01-11-88 21-06-88
EP A1 432693	19-06-91	JP A2 4018029 CA AA 2031973 JP A2 3236325	22-01-92 12-06-91 22-10-91
EP A1 357005	07-03-90	DE C0 68905113 DE T2 68905113 EP B1 357005 US A 5096629 JP A2 2167218 JP B4 6074205	08-04-93 16-09-93 03-03-93 17-03-92 27-06-90 21-09-94

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**